

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-84587

(43) 公開日 平成9年(1997)3月31日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 0 1 H 5/00			A 0 1 H 5/00	A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 5/10			C 1 2 N 5/00	C

審査請求 有 請求項の数9 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平7-248149

(22) 出願日 平成7年(1995)9月26日

(71) 出願人 591127076

農林水産省農業生物資源研究所長
茨城県つくば市観音台2丁目1-2

(72) 発明者 肥後 健一

茨城県つくば市並木2丁目7-1-103-
304

(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

(54) 【発明の名称】 イネC a t B遺伝子プロモーター

(57) 【要約】

【課題】 活性の高い植物プロモーターを提供することおよびイネ等の作物の品種を改良すること。

【解決手段】 イネC a t B遺伝子プロモーターを用いる。特に第1イントロンを含むプロモーターは活性が高い。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で示される配列、またはその一部を有する配列であって配列番号1の配列と同等のプロモーター活性を有する、イネCatB遺伝子プロモーター。

【請求項2】 配列番号2で示される配列、またはその一部を有する配列であって配列番号2の配列と同等のプロモーター活性を有する、イネCatB遺伝子プロモーター。

【請求項3】 請求項1に記載のイネCatB遺伝子プロモーターを有する、植物発現用カセット。

【請求項4】 請求項2に記載のイネCatB遺伝子プロモーターを有する、植物発現用カセット。

【請求項5】 請求項1または2に記載のイネCatB遺伝子プロモーターと発現可能に接続された遺伝子とを含む、組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項5に記載の組換えプラスミドで形質転換された、植物細胞。

【請求項7】 請求項5に記載の組換えプラスミドで形質転換された、植物。

【請求項8】 請求項1または2に記載のイネCatB遺伝子プロモーターを有する組換えプラスミドを作製する工程；該組換えプラスミドで植物細胞を形質転換する工程；該形質転換された植物細胞を培養する工程；を含む、組換え蛋白質の製造方法。

【請求項9】 請求項1または2に記載のイネCatB遺伝子プロモーターを有する組換えプラスミドを作製する工程；該組換えプラスミドで植物細胞を形質転換する工程；該形質転換された植物細胞を培養する工程；を含む、組換え植物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本願発明は、植物遺伝子のプロモーターを用いる、有用物質の生産あるいは有用植物の育種に関する。さらに詳しくは、イネのカタラーゼ遺伝子B（以下、CatBという）のプロモーター遺伝子を用いる、有用物質の生産あるいは有用植物の育種に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、植物遺伝子の発現に関して使用されるプロモーターは、種々知られている。例えば、アグロバクテリウム属のT-DNAプロモーター、ノバリンシンセターゼ（NOS）プロモーター、オクトピンプロモーター等が知られている。また、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）プロモーターも植物遺伝子プロモーターとして汎用されている。しかし、その活性は、実用的に用いられるには低いという問題点がある。

【0003】ところで、細胞中の活性酸素種（スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素など）の濃度が上昇した状態を、酸化ストレス

（oxidative stress）と呼ぶ。これは、過酸化状態、紫外線や放射線、チトクロームの電子伝達系の異常、ペルオキシソーム異常増加、高温・低温・化学物質等の非生物的作因、オゾンや二酸化硫黄のような大気汚染物質等が引き起こす「酸化状態」と、細胞内の「抗酸化剤防御機構（スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、カタラーゼ（CAT）、ペルオキシダーゼ、ビタミンE、C及びA、等）」のバランスが崩れたときに起きる。

【0004】真核生物では、酸化ストレスに曝されるとSODやCAT活性が高まるということが以前から知られていた。また、あらかじめSODやCATを誘導しておくと、細胞は酸化ストレスに対して若干の抵抗性を示すことも観察されていた。

【0005】植物においても、酸化ストレスが生じることが知られている。例えば、①光合成を妨げる様々な条件（光照射下の低温や除草剤処理など）によって、光合成反応経路等に起因する活性酸素種が、異常に発生する、②暗所でも、植物が低温に曝されると過酸化水素等の活性酸素種の濃度上昇がある、③除草剤（パラコート等）や紫外線もその作用機構に活性酸素種が関わっている、および、④乾燥ストレスや重金属なども、酸化ストレスを引き起こすと考えられている。

【0006】植物は、酸化ストレスに対抗するために抗酸化剤防御酵素系が協調してこれらの活性酸素種を消去する等の、種々の防御反応を行っている。最近になって②の低温耐性にカタラーゼの関与を強く示唆する実験結果が報告された。

【0007】他方で、病原菌の感染のような生物的刺激に対して、植物細胞はその表面でOxidative burstと呼ばれる急速な活性酸素種発生を行うことが知られている。この現象は、従来、病原菌を攻撃するためと解釈されてきた。しかし、最近になって、この現象は、細胞内部の種々の防御遺伝子の発現を誘導するカスケードをスタートさせるためのシグナルとしても機能していることが判ってきた。植物ウイルス感染時にも、過酸化水素が防御タンパク質誘導に関与していることが最近明らかにされた。これらの新しい知見は、過酸化水素などの活性酸素種の濃度を制御するカタラーゼが情報伝達の制御に関わっていることを示唆するものとして注目されている。

【0008】そのひとつはトウモロコシ幼苗の低温馴化（Chilling acclimation）による耐冷性獲得のメカニズムとして、馴化過程での微量過酸化水素蓄積によるカタラーゼ（Cat3）遺伝子発現の誘導が報告されている。また、タバコにおける病原体によるPR蛋白質（Pathogenesis-related proteins）の誘導メカニズムとして、サリチル酸がカタラーゼを阻害し、細胞中の過酸化水素濃度が上昇してPR蛋白質を誘導すると報告されている。これらは植物細胞でも活性酸素種自体が活性酸素

消去系遺伝子の誘導に直接関わっている可能性を示唆するものであり、また、過酸化水素濃度を調節する消去系酵素群がシグナル制御の役割を持つ可能性がある。

【0009】他方、イネでは、イネ種子の低温発芽性と種子中のカタラーゼ活性の高さの相関関係が示唆されている（谷田ら、農芸化学会1990年年会）。また、低酸素条件下である水中で発芽させたイネ芽生えを空気中に出すことによって酸素分圧を急激に上昇させたときに、カタラーゼ遺伝子が特異的に発現することが、最近になって明らかにされた（森田ら、植物生理学会1994年度講演要旨集、115頁）。

【0010】従って、イネのカタラーゼ遺伝子のプロモーターは、種々のシグナルに対して、反応し得る可能性が高く、活性が高いプロモーターが見いだせば、非常に有用であると考えられる。例えば、

①カタラーゼ構造遺伝子と組み合わせ、耐冷性の低い植物（インディカ種のイネあるいは野菜など）に導入して耐冷性を付与すること、

②カタラーゼ構造遺伝子と組み合わせ、日本で最も多く栽培されているジャポニカ種イネに導入して、耐冷性を強化すること、

③カタラーゼ構造遺伝子と組み合わせ、種子中にカタラーゼを高濃度に蓄積させ、低温発芽性あるいは水中発芽性を上昇させて、直播きに適したイネを作出すること、

④カタラーゼ構造遺伝子と組み合わせC3植物に、ペルオキシソーム局在型カタラーゼをコードする遺伝子を導入し、ペルオキシソームにより多く蓄積させることにより、光呼吸を抑制し、光合成能を高めることが出来る可能性があること、

⑤植物病原菌感染時に発現することが知られている遺伝子（PRタンパク質、キチナーゼ等）のプロモーターと組み合わせ、その下流にイネカタラーゼ遺伝子のエクソン部分を含むDNA断片をアンチセンス方向に挿入して植物に導入し、内在性カタラーゼ遺伝子の発現を抑制することによって、シグナルとして動く過酸化水素濃度を上昇させて防御関連遺伝子の発現を強化することが出来る可能性があること、および、

⑥目的遺伝子を形質転換体の中で高い効率で安定的に発現し得る汎用ベクターの開発が期待されること、等の有用性が考えられる。

【0011】従って、イネの遺伝子から、活性が高く、実用的にも使用され得るプロモーターが取得できれば、イネ等の作物の品種改良のみならず、他の植物細胞における物質生産用の汎用ベクターが開発でき、植物細胞を用いる物質生産に大いに貢献できると考えられる。

【0012】イネのカタラーゼの構造遺伝子としてはカタラーゼA（CatA）、CatB、およびカタラーゼC（CatC）遺伝子が知られており、それぞれ相同性が高い配列を有している。CatBのcDNAはその配

列が知られている（Plant Physiol. (1994) 105:1015-1016）。

【0013】しかし、これらの遺伝子のプロモーターの解析は全くなされておらず、プロモーターの位置も特定されていないのが現状である。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】本願発明は、上記問題点を解決すること、およびイネ等の作物における育種を目的としており、従来、汎用されているCaMVプロモーターよりも、非常に高い活性を有する植物遺伝子プロモーターを提供することにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】本願発明は、イネのカタラーゼB（CatB）遺伝子のプロモーター活性が非常に高いことを見いだして完成されたものである。

【0016】本願発明は、配列番号1で示される配列、またはその一部を有する配列であって配列番号1の配列と同等のプロモーター活性を有する、イネCatB遺伝子プロモーターに関する。

【0017】本願発明は、配列番号2で示される配列、またはその一部を有する配列であって配列番号2の配列と同等のプロモーター活性を有する、イネCatB遺伝子プロモーターに関する。この配列は、イネCatB構造遺伝子の第1イントロンを含む配列である。

【0018】本願発明は、上記イネCatB遺伝子プロモーターを有する、植物発現用カセットに関する。好適な実施態様においては、配列番号2の配列を含むカセットである。さらに好適な実施態様においては、本願発明の植物発現用カセットは、ノバリンシンセターゼ遺伝子のターミネーター配列を含む。

【0019】さらに、本願発明は、上記イネCatB遺伝子プロモーターと発現可能に接続された外来遺伝子とを含む、組換えプラスミドに関する。

【0020】また、本願発明は上記組換えプラスミドで形質転換された、植物細胞および植物に関する。

【0021】また、本願発明は、組換え蛋白質の製造方法に関し、以下の工程：イネCatB遺伝子プロモーターを有する組換えプラスミドを作製する工程；該組換えプラスミドで植物細胞を形質転換する工程；および該形質転換された植物細胞を培養する工程；を包含する。

【0022】さらに、本願発明は、組換え植物の製造方法に関し、以下の工程：イネCatB遺伝子プロモーターを有する組換えプラスミドを作製する工程；該組換えプラスミドで植物細胞を形質転換する工程；および該形質転換された植物細胞を培養する工程；を包含する。

【0023】

【発明の実施の形態】本願発明のイネCatB遺伝子プロモーターは、配列番号1で示される配列を有している。

【0024】イネCatB遺伝子プロモーターは、イネ

のゲノミックライブラリーからスクリーニングされ得る。米国クローンテック社 (CLONTECH Laboratories Inc., Palo Alto, CA) が市販しているイネのゲノミック DNA ライブラリー (RICE Genomic Library) が用いられ得る。

【0025】プローブとしては、本願発明者らが単離したイネ *CatA* cDNA が用いられ得る。イネ *CatA* 構造遺伝子とイネ *CatB* 構造遺伝子とは、構造が類似する部分があるので、その共通部分が用いられ得る。なお、ゲノミック *CatA* 遺伝子の塩基配列は、日本農芸化学会1992年大会講演要旨集：日本農芸化学会誌66 (3)、488(1992)) で発表されている。

【0026】まず、イネゲノミック遺伝子ライブラリーを、ファージ入を用いて作製し、ブラークを形成させる。このブラークを常法に従って、ニトロセルロース等のメンブレンに移し、標識したプローブでハイブリダイズさせる。ハイブリダイズ終了後、洗浄し、オートラジオグラフィーにかけ、ハイブリダイズすることが確認されたファージからDNAを調製する。

【0027】調製したファージDNAを、適当な制限酵素を組み合わせて消化し、その消化物をアガロースゲル電気泳動で分離する。分離したDNA断片をナイロンメンブレンに移して、上記のプローブをハイブリダイズさせ、シグナルの強さとバンドのパターンの相違に基づいて、スクリーニングする。

【0028】シグナルの強さとバンドのパターンが *CatA* 遺伝子のそれとほぼ一致するクローンは *CatA* 遺伝子に対応すると考えられる。従って、バンドのパターンが一部しか一致しないクローンは、*CatA* 遺伝子の欠損クローン、あるいは *CatA* 以外の別のカタラーゼ遺伝子のクローンである可能性がある。さらに、*CatA* cDNA をプローブとして用いて、下記のような緩い条件と厳しい条件でのハイブリダイゼーションを行って、パターンを比較する。このパターンの比較で、*CatA* 以外の別のカタラーゼ遺伝子であることが推定される。PCR等の方法あるいは塩基配列を決定して、異なるカタラーゼ遺伝子であることを確認し得る。

【0029】このようにして、*CatA* 以外のゲノミックのカタラーゼ遺伝子が、単離され得る。本願においては、2つの異なるゲノミックのカタラーゼ遺伝子、*CatB* および *CatC* が単離された。

【0030】これらの配列の情報に基づいて、プロモーター領域が特定され得る。プロモーター配列は、イントロンを有する場合は、プロモーター自体だけでなく、第1イントロン等の領域をも含み得る。

【0031】*CatB* 遺伝子のプロモーター配列が特定されると、その配列を切り出して、植物用発現ベクターにつなぎ込み得る。つなぎ込まれたプロモーターの活性は、そのプロモーターの下流に適当な酵素をコードする遺伝子を連結し、その遺伝子の発現を、例えば、酵素活

性を測定して、測定する。植物を宿主とする場合には、例えば、pB1221等のようなプラスミドを用いて、 β -グルクウロナーゼ (GUS) の発現を指標として測定するのが一般的であり、本願明細書においても、GUSの発現で測定する方法が適用され得る。

【0032】GUS活性は、Jeffersonらの方法 (EMBO J 6: 3901-3907(1987)) に基本的に従って測定され得る。すなわち、タンパク質量にして50 μ g 相当のプロトプラスト抽出液と25 μ l の20mM 4-methyl umbelliferyl glucuronide (4MUG)、それに抽出バッファー、さらに植物組織内在性のGUS様活性を抑制するために100 μ l メタノール (Kosugi et al., Plant Sci 70: 133-140 (1990)) を加えて全量を500 μ l とし、37°Cでインキュベートする。0時間と2時間後に反応液から200 μ l を採取し、0.2M Na_2CO_3 を0.8ml 加えて反応を停止させる。蛍光分光光度計により、365nmの励起光で455nmの蛍光を測定する。2時間試料の値から0時間試料の値を引き、酵素活性を4-MU pmoles/min/mg proteinで表示する。

【0033】いったん *CatB* 遺伝子のプロモーター領域が特定されると、さらにその配列を改変して、プロモーター活性が高めることも本発明の範囲内である。例えば、*CatB* 遺伝子のプロモーター領域に不要な配列を除去して、あるいは一部改変して得られる、改変前と同等あるいはそれ以上の活性を有する配列も本願発明の範囲内にある。

【0034】活性が確認された *CatB* 遺伝子のプロモーターは、適当な植物発現ベクターに組み込まれ得る。この植物発現用ベクターに組み込まれたプロモーター配列の3'末端側に、適当なリンカー配列、例えばマルチクローニングサイトを有するリンカーを導入して、植物宿主に適した発現カセットが作製され得る。この発現カセットには、発現効率を向上させるため等の目的で、ターミネーター配列が含まれ得る。このターミネーター配列は、上記マルチクローニングサイトを有するリンカー配列を介して、プロモーター配列と結合され得る。

【0035】上記植物用発現カセットのマルチクローニングサイトに、あるいは、プロモーターの下流に、外来遺伝子が発現可能に接続される。このようにして生じた組換えプラスミドは、常法に従って、植物細胞をプロトプラスト化して、形質転換され得る。植物細胞のプロトプラストの作製は、Mol Gen. Genet 206: 408-413(1987)に記載の方法に従って行い得る。例えば、継代後5日目のカルス細胞サスペンションを直径10cmプラスチックシャーレに移し、アスピレーターで培地を除いて酵素液 (例えば、4% セルラーゼRS (ヤクルト)、1% マセロザイムR10 (ヤクルト)、0.4M マンニトール、0.5% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、及び0.5% Potassium Dextran Sulfate) 20ml を加え、パラフィルムをして28°Cの暗

所に静置する。約5時間後にナイロンメッシュで濾過して未消化物を取り除き、洗浄操作を繰り返してから、エレクトロポレーション等に用いる。

【0036】形質転換された植物細胞は、そのまま、外来遺伝子がコードする有用物質の生産に使用され得る。有用物質の回収は、細胞外から、あるいは細胞内から、常法に従って行われ得る。さらに、形質転換された植物細胞を分化させて、形質転換された植物組織、あるいは植物体とし得る。

【0037】さらに、イネCatB遺伝子は、細菌と植物の両宿主で発現可能なバイナリーベクターに組み込むことが可能である。このようなバイナリーベクターは当業者に周知である。例えば、アグロバクテリウムの発現系を用いると、微生物による感染のシステムが利用され得る。そして、例えば、タバコ等の植物に導入され得る。従って、植物体の形質転換にも、使用され得る。

【0038】イネCatB遺伝子は、酸化ストレス等の種々のシグナルに対して、反応し得る可能性が高い。従って、そのシグナルに応じて種々の段階で発現させることが可能である。即ち、発現の調節が自由に行われ得ると考えられる。

【0039】従って、イネの遺伝子から、活性が高く、実用的にも使用され得るプロモーターが取得できれば、イネの品種改良のみならず、他の植物細胞における物質生産用の汎用ベクターが開発でき、植物細胞を用いる物質生産に大いに貢献できると考えられる。また、種々の植物体への遺伝子導入にも使用され得る。

【0040】以下に、実施例に基づいて本願発明を説明するが、本願発明の範囲は、実施例のみに限定されるものではない。

【0041】

【実施例】

(イネCatBゲノミック遺伝子の単離：ゲノミックライブラリーからのスクリーニング) CatA cDNAの一部を、CatB遺伝子のクローニングに用いた。CatA cDNAのクローニングの過程で得られた不完全長cDNA(全長約1.8kbpのうち、5'非翻訳領域及び若干のコード領域の合計約450bpを欠損する3'末端側の1.35kbp)を含むラムダファージ(クローン#51)のインサート部分をPCRで増幅した。同ファージよりDNAを調製してこれをテンプレートとし、プライマーとしてλgt11-Forward Primer及びλgt11 Reverse Primer(東洋紡)を用いた。生成物をセントリコンー100(amicon)で精製し、濃度を25ng/10μlにして、マルチプライムラベル法(Amersham)のプロープとした。

【0042】米国クローンテック社(CLONTECH Laboratories Inc., Palo Alto, CA)から購入したイネのゲノミックDNAライブラリー(RICE Genomic Library)を用いて、CatB遺伝子をスクリーニングした。ゲノミックライブラリーを構成するファージλEMBL-3を

常法に従って、E. coli NM538株に感染させ、ファージブランクを形成させた。このファージブランクをナイロンメンブレンに移し、下記の標準的条件で上記プロープとハイブリダイズさせた。なお、プロープは、³²Pで標識した。

【0043】ハイブリダイズ溶液：6x SSC-0.1% SDS, 5x Denhardt's, 100μg/ml salmon sperm DNA; ハイブリダイズ温度：65°C; ハイブリダイズ時間：overnight。

【0044】次に、メンブレンを、以下の比較的緩い条件で洗浄した。洗浄条件：2x SSC-0.1% SDS 室温5分

プラス30分; 1x SSC-0.1% SDS 68°C, 1時間。

【0045】洗浄後、常法に従って、ナイロンメンブレンをオートラジオグラフィーにかけ、プロープとハイブリダイズしたクローンを検出した。ハイブリダイズすることが確認されたファージからそれぞれDNAを調製した。

【0046】上記ファージのDNAをSalIとScaIの制限酵素を組み合わせで消化し、その消化物をアガロースゲル電気泳動で分離した。分離したDNA断片をナイロンメンブレンに移して、上述のCatA cDNA断片をプロープとしてハイブリダイズさせた。ハイブリダイズの条件は上記と同じであり、メンブレン洗浄は以下の条件で行った。洗浄条件：2x SSC 室温 5-10分 2回; 2x SSC-0.1% SDS 65°C, 30分。

【0047】洗浄後、常法に従って、ナイロンメンブレンをオートラジオグラフィーにかけ、プロープとハイブリダイズしたDNA断片を検出した。

【0048】シグナルの強さとバンドのパターンがほぼ同一の、従って同じ構造を持つと推定される一群のクローンと、バンドのパターンが一部しか一致しないクローンとがある。

【0049】前者のシグナルの強さとバンドのパターンがほぼ一致するクローンはCatA遺伝子に対応すると考えられた。実際、No. 74のクローンは、CatA cDNAに対応する遺伝子であった。

【0050】他方、後者のバンドのパターンが一部しか一致しないクローンは、CatA遺伝子の欠損クローン、あるいはCatA以外の別のカタラーゼ遺伝子のクローンである可能性がある。そこで、CatA cDNAをプロープとして用いて、下記のような緩い条件と厳しい条件でのハイブリダイゼーションを行って、パターンを比較した。

【0051】緩いハイブリダイズ条件：50% フォルムアミドを添加した、6x SSC-0.1% SDS, 5x Denhardt's, 100μg/ml salmon sperm DNA; ハイブリダイズ温度：37°C; ハイブリダイズ時間：overnight。

【0052】メンブレン洗浄条件は上記と同じであり、2x SSC-0.1% SDS 室温5分プラス30分; 1x SSC-0.1% SDS 68°C, 1時間であった。

【0053】厳しいハイブリダイズの条件：50% フォル

ムアミドを添加した、6x SSC-0.1%SDS, 5x Denhardt's, 100µg/ml salmon sperm DNA; ハイブリダイズ温度: 42°C; ハイブリダイズ時間: overnight.

【0054】メンブレン洗浄条件は、2x SSC-0.1% SDS 室温5分プラス30分; 1x SSC-0.1% SDS 68°C、1時間であった。

【0055】厳しい条件でのハイブリダイズの結果、標準的ハイブリダイズのパターンと同じ数のバンドが検出された。他方、緩い条件のハイブリダイズでは、厳しい条件のハイブリのパターンよりも多数のバンドを示した。これらの結果から、バンドのパターンが一部しか一致しないクローンは、Cat A遺伝子の欠損クローンではなく、Cat Aに似てはいるが、塩基配列が異なる部分を持つDNA、すなわちCat A以外の別のカタラーゼ遺伝子である可能性が高いことが判った。

【0056】約20個の、バンドのパターンが一部しか一致しないクローンを、カタラーゼアイソザイム遺伝子候補としてさらに解析した。この内のNo. 7クローン*

CGTCGATTCTCATCTCTCCACAACAAATC: 配列番号4 (CatB cDNAの102-131に相当)

CAATGTCTCAGGGCTTCCAGCTCATGCAC: 配列番号5 (CatB cDNAの484-455に相当)

他方、イネカルスから、cDNAライブラリーを調製した。このcDNAライブラリーのDNAをテンプレートとし、上記二つの合成DNAをプライマーとして、標準的条件でPCRを行った。約400bpのDNA断片が増幅された。この400bp DNA断片をプローブとして用い、上記Cat B遺伝子と思われるクローン群を再度スクリーニングし、ハイブリダイスする数個のクローンを得た。

【0060】この中の、上記No. 6クローンは、PCR増幅した400bpの上流に、約1kb以上の5'上流域を持ち、且つ全長が約5kb以上であることがわかった。このクローンをクローンU6と命名した。クローンU6の制限酵素地図を作製した。図1にその制限酵素地図を示す。

【0061】クローンU6から、5'上流域を約1kb含む断片 (Sal I-Eco R I消化断片) とその下流の断片 (Eco R I-Eco R I消化断片) を切り出し、シーケンス解析用のベクター (pUC18) に挿入し、5'側から及び3'側からの段階的欠損プラスミドを多数作成し、塩基配列決定を行った。4985bpの配列が決定された。配列番号3にその全配列を示す。

【0062】(Cat 遺伝子プロモーターを有する組換えプラスミドの作製) 得られたCat B遺伝子は、4985bpであった。そして、配列番号3の1073番目から1216番目に第1エクソン、1333番目から1429番目に第2エクソン、2341番目から2618番目に第3エクソン、2970番目から3746番目に第4エクソン、3968番目から4057番目に第5エクソン、4252番目から4319番目に第6エクソン、4410番目から4503番目に第7エクソン、および4616

*は、詳細なサザン分析、部分塩基配列の解析、Cat A塩基配列に基づくPCR分析などから、Cat Aとは異なるカタラーゼ遺伝子であると結論した。また、Cat B cDNAとも異なる配列であることがわかり、Cat Cと命名された。Cat Cの塩基配列は、日本農芸化学会1994年大会にて発表されている(講演要旨: 日本農芸化学会誌68, 404(1994))。

【0057】Cat AともNo. 7クローン (Cat C) と異なるパターンを示すクローンがあり、その中からNo. 6クローンをさらに詳細に解析した。No. 6クローンのDNAについては、部分的に塩基配列も解析した。この配列は、Cat B遺伝子のcDNA配列 (Plant Physiol.(1994) 105:1015-1016) と一致した。

【0058】これらの情報を基に、Cat B遺伝子の5'非翻訳領域を得るために二つのDNAオリゴマーを合成した。

【0059】

番目から4881番目に第8エクソンが存在すること、および、それぞれのエクソンの間に、第1から第7イントロンが存在することがわかった。

【0063】上記配列から、プロモーター領域は、1073番目より前の配列と推定された。

【0064】この配列情報に基づいて、プロモーター領域を切り出すことができる。

【0065】イネCat B遺伝子プロモーターを有するプラスミド、Cat B-GUS-Δ0の作製を図2に示す。

【0066】クローンU6をSal IおよびEco R Iで切断し、2.3kbの断片を切り出した。この断片を、Sal I-Eco R I切断したpUC18に連結した。得られた組換えプラスミドを、Eco 47 I (東洋紡(株)製)で消化し、約2kbの断片を回収した。この断片をDNAポリメラーゼのKlenow断片で消化し、ついで、Pst Iで消化した。クローンU6の7番目から1370番目までの配列 (配列番号2) を有する断片Aが得られた。この断片Aには、第1エクソンの上流側の配列、第1エクソン、第1イントロン、および、第2エクソンの一部が含まれていた。断片Aの5'末端側は、Pst I部位であり、3'末端は平滑末端である。

【0067】植物細胞用発現ベクターpBI221 (加シグ社) は、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーター、β-グルクウロナーゼ (GUS) コーディング領域およびノバリンシンセターゼのターミネーター (NOS-T) を有している。このpBI221を、Pst IおよびSma Iで消化し、Pst I-Sma I大断片Bを回収する。この大断片Bは、pB

1221から、CaMVの35Sプロモーター領域が削除されている断片である。この大断片Bと、上記クローンU6の7番目から1370番目までの配列を有する断片Aとを連結させ、CatB-GUS-Δ0を作製した。

【0068】同様にして、図3および図4に示す方法で、それぞれ、CatAおよびCatC遺伝子のプロモーター領域をGUS遺伝子に接続したプラスミド、CatA-GUS-Δ0、およびCatC-GUS-Δ0を作製した。CatA-GUS-Δ0には、1606番目から1893番目に、CatC-GUS-Δ0には、1229番目から1324番目にイントロンが存在している。

【0069】得られたプラスミド、CatA-GUS-Δ0、CatB-GUS-Δ0、およびCatC-GUS-Δ0を、イネOc細胞に導入した。コントロールとして、pBI221を用いた。

【0070】(イネ細胞の形質転換とGUS遺伝子の発現) 300mlのフラスコに、以下の組成のAA培地を70ml入れ、イネOc細胞を、緩やかに攪拌(90rpm)しながら、28℃で、懸濁培養した。

【0071】AA培地の組成(Mol. Gen. Genet. 161: 67-76(1978))

1) 無機塩 濃度 (mg/l)

MnSO ₄ .4H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .2H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
KI	0.75
CaCl ₂ .2H ₂ O	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	250
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150
KCl	3,000

2) 鉄分

Fe-EDTA	40
---------	----

3) ビタミン・有機物

蔗糖	20,000
ニコチン酸	1
塩酸チアミン	10
塩酸ピリドキシン	1
myo-イノシトール	100
L-アルギニン	177
L-グリシン	7.5
L-グルタミン	900
L-アスパラギン酸	300

4) ホルモン酸

2, 4-D	1
カイネチン	0.2
G A 3	0.1

1週間毎に、10mlの培養物を70mlの新鮮な培地に移した。移してから5日目の細胞を用いて、プロトプラストを作製した。プロトプラストの作製は、Mol Gen.

Genet 206: 408-413(1987)に記載の方法に従った。継代後5日目のカルス細胞サスペンションを直径10cmプラスチックシャーレに移し、アスピレーターで培地を除いて酵素液(4% セルラーゼRS(ヤクルト)、1%

マセロザイムR10(ヤクルト)、0.4M マンニトール、0.5% CaCl₂ .2H₂O 0.5% Potassium Dextran Sulfate) 20mlを加えた。パラフィルムをして28℃の暗所に静置した。約5時間後にナイロンメッシュで濾過して未消化物を取り除き、洗浄操作を繰り返した。

【0072】得られたプロトプラストをEP緩衝液(5mM MgCl₂, 70mM KCl, 0.1% MES, 0.4M マンニトール、蒸留水を加えてpH5.6とし、フィルターで滅菌する: Nature 338: 274-276(1989))に懸濁し、その一部(0.5ml)をとり、上記プラスミドDNA 20μg/mlおよびキャリアDNAとしてのサケ精子DNA 30μg/mlと混合した。次に、Gene-Pulser(Bio-Rad, CA)を用いて、電極間距離0.4cmのディスポーサブルキューベット中で、500μFのキャパシタンスおよび100Ωの抵抗で、300V/cmでエレクトロポレーションした。氷上で10分インキュベートした後、プロトプラストに1.5mlのR2P培養液を添加してMillicell(Millipore, CA)に入れ、これを5mlのR2P培地(Plant Cell Physiol. 14:1113-1121(1973))を含む6cmプラスチックディッシュに入れる。Millicellの外側にナースセルを添加し、28℃、暗条件で培養した。なお、ナースセルの有無は、CatA-GUS-Δ0, CatB-GUS-Δ0, およびCatC-GUS-Δ0の発現には影響を及ぼさなかった。

【0073】R2P培地の組成

(1) Major elements(mg/l)

KNO ₃	4000
(NH ₄) ₂ SO ₄	335
MgSO ₄ .7H ₂ O	250
CaCl ₂ .2H ₂ O	150
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	273

(2) Minor elements(mg/ml)

MnSO ₄ .4H ₂ O	1.6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.125
H ₃ BO ₃	3.0
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.125
Na ₂ EDTA	7.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	5.5

(3) 有機成分(mg/ml)

イノシトール	100
ニコチン酸	1.0
ピリドキシン塩酸	1.0

13
 チアミン塩酸 10
 蔗糖 (g/l) 137
 2, 4-D (mg/l) 2.0
 pH 5.6
 GUS活性用のプロトプラストの処理は、基本的には、ラボマニュアル：植物遺伝子の機能解析（岩淵雅樹・志村令郎編、丸善、1992）p. 55の記述に従って行った。エレクトロポレーション処理後、4日間、28℃、暗所にて培養したプロトプラストを、1mlファルコン・ビベット（#7521）で1.5mlマイクロチューブにとり、室温で9,000rpm、3分間遠心し、ベレットを分析まで-80度の保存した。
 【0074】ベレットに200μlの抽出バッファー（50mMリン酸ナトリウムバッファー（pH7.0）、10mM Na₂EDTA、0.1% TritonX-100、0.1% Sodium Lauryl Sarcosine、10mM β-メルカプトエタノール）を加え、氷水中で5分、凍結したベレットを融解した。超音波処理装置（Branson Sonifier model 250）を用いて、Output control 2、Dutycycle 10%の条件で、1分間処理した。処理後、15,000rpm、20分間、4℃で遠心分離した。上清（プロトプラスト抽出液）をとり、GUS活性測定用のサンプルとした。サンプル中のタンパク質濃度はBradford法（AnalBiochem 72: 248-254(1976)）で決定した。
 【0075】GUS活性は、上記のJeffersonらの方法に従った。内在性のGUS活性は、反応液に20%（V*

配列

GTGCACCTGC AGGTCAACGG ATCTTATTTT TCCATTATAA TATATATAAT AAATAAATAT 60
 ATGTTTACIT TTATTATAGT ACTTTAAAAG ATAAATCTAT ATATGTTGTT CTAGTTCCTT 120
 TAAACTAAAT ATTATTAAAG TTATTAATCG TTAAGTTAT AAAAGTTTGA TATCAAATCT 180
 GTCCAAAATG TCGATTAATA TCGAACCGGA GCCAGTACAG TATTAGTACC AAGTCAGCCA 240
 CATGGGACAT GCGCCACATG CATGCACGTC GTATGAACAC ACCGTGATTC TTTGCCACTT 300
 GCATAATATT CTAGCACTGC TATACTACAC GACGACTGAC GCGGACGTC GTTCAGTTTA 360
 GTTTCGCCGA TCCATCGCGA AGGCTACTCT ACCCATCCCA TTTTITTTTA AAAAAAATA 420
 CTATAAATCT AAATATCTTA CATTAGATTT GTATATTTTA AAGCAAAGAG AATAATATGT 480
 AGATATAAGT ATGTACCTAC TCGCTCGACC ACAAGATCAC TGCAACAAGC ATTGAAGATC 540
 GCTCCTAGCA ATGGTCTCAA CTTACCATGT AAACCTAAGAG CAATATAAT GTTTTCTTTT 600
 TATTAGGAAT GGTTCATCT TATATTTTGA GATTGAGAAA ACACATATAG AAATTATACA 660
 GGATTTAGCA TTTGGGATGC CGGCCGGATT CCTGATTTCC CAGTCTCTGG CTTTCTTTT 720
 AAACAAAAC GAAAAAGCA GTGATCCGAT CGATCACGAT GAGCGAGCTA GTAAGCTCCA 780
 AAACAAAATA GAGTACGTAC GTATAATCCT AGAGTCCCGA TAATAATAAT CCGTTTGGTT 840
 CGCGTTAAAA AAGTCTTATC TCCTCGTGAT CCCTTTTITT GGATCGATCC ATGTTCTGTAG 900
 TACGTGACAA GCACCCGCAC CAACCGAAGC AGGTACCTGT GTCGCTGCT GTGGGCCCCA 960
 CACACCCCA GACGCCATT AATAAACAAA CACGACGTGG ACGAAGAGAA CGGAGCCCCG 1020
 CAAGAAGCAT ACTAGCACGC TACGAAACCC CCCTTCTCTT CGTCCCAAAA TT 1072

配列番号：2

配列の長さ：1364

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

14

* /V) のメタノールを加えることにより最少にした。実験結果は、少なくとも2回の実験の結果であり、それぞれの実験には、同一試料について3つのサンプル（トリプリケート）が含まれていた。

【0076】結果を図5に示す。この結果は、CatB遺伝子プロモーターが、コントロールであるCaMV、CatAおよびCatCのプロモーターに比べて、非常に高い活性を示した。

【0077】

10 【発明の効果】本願発明のCatB遺伝子プロモーターは、従来植物用の汎用プロモーターとして使用されているCaMVに比べて、非常に高い活性を有している。従って、植物細胞を用いる有用物質の生産、およびイネの等の品種改良に有用である。

【0078】

【配列表】

配列番号 1

配列の長さ：1072

配列の型：核酸

20 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：プロモーター

存在位置：1..1072

特徴を決定した方法：E

配列の種類：Genomic DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：プロモーター

存在位置：1..1364

50 特徴を決定した方法：E

15

16

配列

CTGCAGGTCA ACGGATCTTA TTTTCCATT ATAATATATA TAATAAATAA ATATATGTTT 60
 ACTTTTATTA TAGTACTTTA AAAGATAAAT CTATATATGT TGTCTAGTT CCTTTAACT 120
 AAATATTATT AAAGTTATTA ATGGTTAAAG TTATAAAAGT TTGATATCAA ACTCGTCCAA 180
 AATGTCGATT AATATCGAAC CGGAGCGAGT ACAGTATTAG TAGCAAGTCA CCCACATGGG 240
 ACATGCCCCA CATGCATGCA CGTCGTATGA ACACACCGTG ATTCITTTGCC ACTTCATAA 300
 TATTCTAGCA CTGCTATACT ACACGACGAC TGACGGCGAC GTCAGTTCAG TTTAGTTTGC 360
 CGCATCCATC GCGAAGGCTA CTCTACCCAT CCCATTTTTT TTTAAAAAAA AATACTATAA 420
 ATCTAAATAT CTTACATTAG ATTGTATAT TTTAAAGCAA AGAGAATAAT ATGTAGATAT 480
 AAGTATGTAC CTA CTGCTC GAGCACAAGA TCACTGCAAC AAGCATTGAA GATCGCTCCT 540
 ACCAATCGTC TCAACTTACC ATGTAACTA AGAGCAACTA TAATGTTTTT CTTTATTAG 600
 GAATCGTTGC ATCTTATATT TTGAGATTGA GAAAAACAT ATAGAAATTA TACAGGATTT 660
 AGCATTTTGG ATGCGCGCCG GATTCCTGAT TTCCCACTCT CTGGCTTTCT TTTTAAACAA 720
 AAACGAAAAA AGCAGTGATC CGATCGATCA CGATGAGCGA GCTAGTAAGC TCCAAAAACAA 780
 AATAGAGTAC GTACGTATAA TCCTAGAGTC CGGATAATAA TAATCCGTTT GGTTCGCGTT 840
 AAAAAAGTCT TATCTCCTCG TGATCCCTTT TTTTGATCG ATCCATGTTT GTAGTACGTG 900
 ACAAGCACGC GCACCAACCG AAGCAGGTAC CTGTGTCCTT GCTGTGGGC CCCACACACC 960
 CCAAGACGGC CATTAATAAA CAACACGAC GTGACGAAG AGAAGGAGG CCGCAAGAA 1020
 GCATACTAGC ACGCTACGAA ACCCCCTTC TCTTCGTCCC CAAATTGCAC TACAAAAAAG 1080
 GCGGCCCCCT TCTTCTCTCC TCGTCTTAT CACCACCAAT CCGATCCTCT TCTTCTCT 1140
 TCTTCTCTC CCCACATCCA GTTCGATTCT CATCTCTCCC ACAACAAATC ACGCCATGGA 1200
 TCCCTACAAG GTGCGGCTT TTCTGATT TCTTTCTTC TAGATCGATC GTCGATTGCG 1260
 TTTGGTTTGG TTTCTTGATG CGCTATCCC AATCTGACTG ACTCACTGGA TTCCTCTCC 1320
 TTGCAGCATC GCGCGTCCAG CGGAGCAAT TCCACCTTCT GGAC 1364

配列番号: 3

配列の長さ: 4985

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: イネ

配列の特徴

特徴を表す記号: エクソン 1

存在位置: 1073..1216

特徴を決定した方法: S

配列の特徴

特徴を表す記号: エクソン 2

存在位置: 1333..1429

特徴を決定した方法: S

配列の特徴

特徴を表す記号: エクソン 3

存在位置: 2341..2618

特徴を決定した方法: S

配列

GTGCAGCTGC AGGTCAACGG ATCTTATTTT TCCATTATAA TATATATAAT AAATAAATAT 60
 ATGTTTACTT TTATTATAGT ACTTTAAAG ATAAATCTAT ATATGTTGTT CTAGTTCCTT 120
 TAAACTAAAT ATTATTAAAG TTATTAATGG TTAAAGTTAT AAAAGTTTGA TATCAAACCTC 180
 GTCCAAAATG TCGATTAATA TCGAACCGGA GCGAGTACAG TATTAGTAGC AAGTCAGCCA 240
 CATGGGACAT GCGCCACATG CATGCACGTC GTATGAACAC ACCGTGATTG TTTGCCACTT 300

* 配列の特徴

特徴を表す記号: エクソン 4

存在位置: 2970..3746

特徴を決定した方法: S

配列の特徴

30 特徴を表す記号: エクソン 5

存在位置: 3968..4057

特徴を決定した方法: S

配列の特徴

特徴を表す記号: エクソン 6

存在位置: 4252..4319

特徴を決定した方法: S

配列の特徴

特徴を表す記号: エクソン 7

存在位置: 4410..4503

40 特徴を決定した方法: S

配列の特徴

特徴を表す記号: エクソン 8

存在位置: 4616..4881

* 特徴を決定した方法: S

17	18
GCATAATATT CTAGCACTGC TATACTACAC GACGACTGAC GCGGACGTCA GTTCAGTTTA	360
GTTTGCCCGCA TCCATCCGCA AGGCTACTCT ACCCATCCCA TTTTCTTTTA AAAAAAATA	420
CTATAAATCT AAATATCTTA CATTAGATTT GTATATTTTA AAGCAAAGAG AATAATATGT	480
AGATATAAGT ATGTACCTAC TCGCTCGACC ACAAGATCAC TCCAACAAGC ATTGAAGATC	540
GCTCCTAGCA ATGGTCTCAA CTTACCATGT AAATAAGAG CAACTATAAT GTTTTCTTTT	600
TATTAGGAAT GGTTCATCT TATATTTGA GATTGAGAAA ACACATATAG AAATTATACA	660
GGATTTAGCA TTTGGGATGC CGGCCGGATT CCTGATTTCC CAGTCTCTGG CTTTCTTTT	720
AAACAAAAC GAAAAAGCA GTGATCCGAT CGATCACCAT GAGCGAGCTA GTAAGCTCCA	780
AAACAAAATA GAGTACGTAC GTATAATCCT AGAGTCCCGA TAATAATAAT CCGTTTCGTT	840
CGCGTTAAAA AAGTCTTATC TCCTCGTGAT CCTTTTCTTT GGATCGATCC ATGTTCTGAG	900
TACGTGACAA GCACCCGCAC CAACCGAAGC AGGTACCTGT GTCGCTGCCT GTGGGCCCCA	960
CACACCCCAA GACGCCATT AATAAACAAA CACGACGTGG ACGAAGAGAA GCGAGCCCGG	1020
CAAGAAGCAT ACTAGCACGC TACGAAACCC CCTTCTCTT CGTCCCCAAA TTGCACTACA	1080
AAAAAGCGCG CCCCTTCTT CTCTCTCTGT CCTATCACC ACCAATCCGA TCCTCTTCTC	1140
TTCTCTTCTC TTCTTCCCA CATCCAGTTC GATTCTCATC TCTCCACAA CAAATCACGC	1200
CATGGATCCC TACAAGGTGC CGCCTTTTCC TGATTTCTT TTCTTCTAGA TCGATCGTCG	1260
ATTTGGTTTG GTTTGGTTT TTGATGCGCT CATCCCAATC TGA CTGACTC ACTGGATTCC	1320
TCCTCTTGC AGCATCGGCC GTCCAGCGCG AGCAATTCCA CCTTCTGGAC CACCAACTCC	1380
GGCGCCCCG TCTGGAACAA CAACTCCGCC CTCACCGTCG GAGAGCGAGG TACTGAGCTG	1440
CTCCATCCTC CATCTTCTC ATCTCTTCT CCACGAATCT ATACTTCTA TCGATCCATG	1500
TGCTTTATGT CTGCTTAGAG GCGTATTTG GCTTGCTTCC ATCATGATCC AATGTTAACT	1560
TTGAGCGATC AGATGCTTAA TAATTTGTCT GTGTCTGTA GCAACAGAAA AGTCCCTGG	1620
ATCTGTGTGA ATTGGACTGT AGCAGCAGCT GTCCGATCT GCCTTACTAT TGTCCTTTA	1680
GAGCTATTCA AAGTTTGCAT CTTTGGTGTG GCGGGGTTT CAGCCTTTG CTTTGAGTAA	1740
CATGTCTTG TCACTACCTT GTGATTCATC TGTGCTGCTT ACACACAAAG AGGAAGATCT	1800
CTAGTTTGGT TGCATATGT TCTTGTATT GCTCGGTAC ACTCCTTCAT CAACGCTAAA	1860
AGACCGAGTC TTGATATTTT TCTCTGTCC TGTCATCTG TCATACCATT AATAAAGAAC	1920
GTATAAAAT TGACCTTTT CCCATTGATA GTAGTGATTA TCTCACTTGT CCTCAGTTCT	1980
AAAAACGAT TCTTGTTTT TGGGGGTTT TTTACCATTA TCGGTTCACT TTACAAAGTA	2040
ATCTGATGAC GATCAAATTT ACTGGAGTAC CAGAGAAGCA CAAGTCTATT TCATACATAT	2100
ATCCAACATG ACTCAAGTTT CGAAAGTCAC TCGAAGTCAT GTTCCAAATG TCATGGTCAC	2160
TAAAAGTACC AAATCTGAC AAAGATGTAT TTCCATCTAG AACTAAGTGC TTCTATCATC	2220
GATCTGTGAA GTTTCTTTT TAGTGTTTT CCTTATTTA TACTCAGCA CTCCTGTATT	2280
TTTGCAATCT GTAATCATGG CTGTTTGTG GTTTGACATG ATGAATCTT CAATCGACAG	2340
GCCCTATCCT CCTTGAGGAC TATCATCTGA TTGAAAAGCT TGACAGTTT GACAGCGACC	2400
GTATCCCTGA ACGTGTGCTT CATGCAAGGG GAGCCAGTGC CAAGGGATT TTTGAGGTTA	2460
CTCATGATAT TTCTCACCTC ACATGTGCTG ATTTTCTCCG TGCTCCTGGT GTTCAGACCC	2520
CAGTTATTGT TCGGTTCTCC ACAGTCTGC ATGAGCGTGG AAGCCCTGAG ACATTGAGGG	2580
AACCAGTGG TTTTGTGTC AAGTTTACA CTAGAGAGGT ACTTGCTCTT TCGCTTCTTT	2640
CTTTCATAGG ATTGTAGGAG GGAGACATTC AGTATAATGT ATTCTTCAAG CATAACGCTG	2700
TAGAATCAAA TGTCTAGTTG TTCTCAGTTG GTTAAGTAGA ACATGAAAGA TTGTTGTCC	2760
TTTACCTCCA CACTCCATAG GTCCAGTGCA TTGCTTAATC TTATATCTAC TAAAGCAAAT	2820
GAGGTAATT TGGTCTTATA TATCTCAAAA GTCTCACACA TTGGACATAT ATCTAACAG	2880
TGTCACCTAC AACTTTGTCT TACTGTTTAT TTA CTGATTT GCATTCACTG CTGCCATATT	2940
TTGATATTTT CTGAGTCAAT GCTTTTCAGG GTAAATTTGA TCTTGTGGG AACAAATATGC	3000
CTGTCTTTT TATCCGAGAT GGGATGAAAT TCCCTGACAT GGTCCATGCT TTCAAGCCAA	3060
GTCCAAAGAC CAATATGCAG GAGAACTGGA GAATAGTTGA TTTCTTTTCA CACCACCCAG	3120
AGAGCCTGCA CATGTTCTCC TTCCTCTTTG ACGATGTAGG CATCCCACTC AACCACAGGC	3180
ACATGAGGG TTTTGGTGT AACACCTACA CCTAATCAA TAAGGATGGA AAGCCTCACC	3240
TTGTCAAAT CCACTGGAAG CCTACCTGTG GTGTCAAATG CCTGTTGGAT GATGAAGCTG	3300

19	20
TGAVTGTTCG CGGCACCTGC CACAGCCATG CCACGAAGCA CTTGACTGAT TCTATTCCAG	3360
CAGCGAATTA CCCACAGTGG AAGCTTTACA TCCAGACTAT TGATCCTGAT CATGAGGACA	3420
GATTTGACTT CGATCCTCTT GATGTCACCA AGACATGCCC AGAGGATATC ATCCCCCTGC	3480
AGCCAGTTGG ACGGATGGTC CTGAACAAA ACATTGATAA CTTCTTTGCA GAAAATGAAC	3540
AGCTTGCTTT CTGCCCAGCG ATAATTGTCC CTGGAATCCA TTAATCTGAT GATAAGCTGC	3600
TCCAGACAAG AATTTTCTCC TATGCTGATA CCCAAAGGCA CCGTCTTGGC CCAAATATT	3660
TGATGCTTCC TGTGAATGCA CAAAATGTG CATACCACAA CAACCACCAC GATGGCTCCA	3720
TGAATTTTAT GCACAGGGAT GAAGAGGTAC TGTGTGTATA TACTTTGAGA GATACATCTC	3780
CTGCATTGAG TTGTTGTGAT GCATCTTTCT GTTTTGTGCC ATTACATATT GTTCTTCCA	3840
GTCACACAA ACAGAATGCG ACTATCATTC AGTTTATTGC ATTTACATCT ATTTGCTTGT	3900
TTTTTAGGTT AACTACTTCC CTTCAATTCA GTTTATTGCA TTTACATCTA TTTGCTTGT	3960
TTTTTAGGTT AACTACTTCC CTTCAAGGTT TGATGCTGCA CGTCATGCTG AGAAGGTCCC	4020
TATTCCTCCT CGTGTCTAA CAGGCTGTCG GAAAAGGTG TGTAACCTGG TCCACTTGAA	4080
CTCCTTCCGC TGTACCTTG TGAGCATGGT TTTGTCCCGC TACATTAGGA GACTATTTGC	4140
TGATTTGGAA TGGGATGAAA TATGATTAT AGATGTGGTA CCCTGGAAAG TACAATGACC	4200
ACATGCATTT GACACAATGT TTTCTGCTC TCTTTTGTG TGGAAATGCA GTGTGTCATT	4260
GACAAGGAGA ACAATTTCCA ACAGGCTGGT GAGAGATACC GGTCAATTGA CCCTGCCACG	4320
TTTGTCTTG TTCAATTTAA TTCGTGTGAA CACATCGAAG AGTTTGAGCA ACAACGCTAA	4380
TTAACTTTT CTTTTGTAT GTAACACAGG CAAGATCGTT TTCTCCAGCG GTGGGTGAT	4440
GCTCTCTCAG ATCCTCGTAT TACACATGAA CTCCTGCGCA TCTGGATCTC CTACTGCTCG	4500
CAGGTAACAT AATTTCTTCG TGGGTGCAAA GTGCTTATCA GTTGTGCTG AGAGATCATG	4560
TACAATTGTA CCTTGATTG ACACACTGAA ACCATATATT TGTGTGTTG TGCAGTGTGA	4620
TGCGTCCCTT GGGCAGAAGC TGGCTTCACG TCTCAACCTG AAACCAACA TGATGATCGG	4680
CCAGGAGGAA TCCAGTGGT GTGCTATGTT GGACAGTCAA ACATGAACCTG TAATCTGTCTG	4740
ACCAGCCGTA GTCGTGAATA AAATGTGATA CCGTGATATG TATACTGCTG ACGCAAGTTG	4800
TGAAACTGTA TCTGGAATCC TGAAATATG CCTTGCTGTG TCTTGGGAAA TGAAACTGTA	4860
TCTGGAATCC TGAAATATG CCTTGCTGTG TCTTGGGAAA ACATCTGCCA TCTCTTGT	4920
GCCTTTGTGT TAAGATGGCT TTAGAGACTG GAACGAACAA CCAGCTGTTT GCCTTTGTGC	4980
CTTTG	4985

配列番号：4

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

30※ 配列の種類：合成DNA

アンチセンス：No

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：イネ

*

配列

GGTCGATTCT CATCTCTCCC ACAACAAATC

30

配列番号：5

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

アンチセンス：Yes

フラグメント型：中間部フラグメント

40 起源：イネ

※

配列

CAATGTCTCA GGGCTTCCAC GCTCATGCAC

30

【図面の簡単な説明】

【図1】クローンU6の制限酵素地図である。

【図2】プラスミドCatB-GUS-△0の作製を示す模式図である。

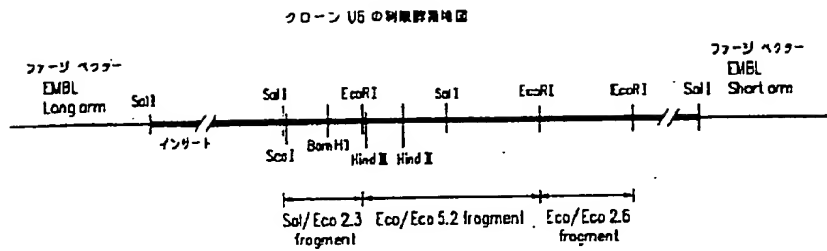
【図3】プラスミドCatA-GUS-△0の作製を示

す模式図である。

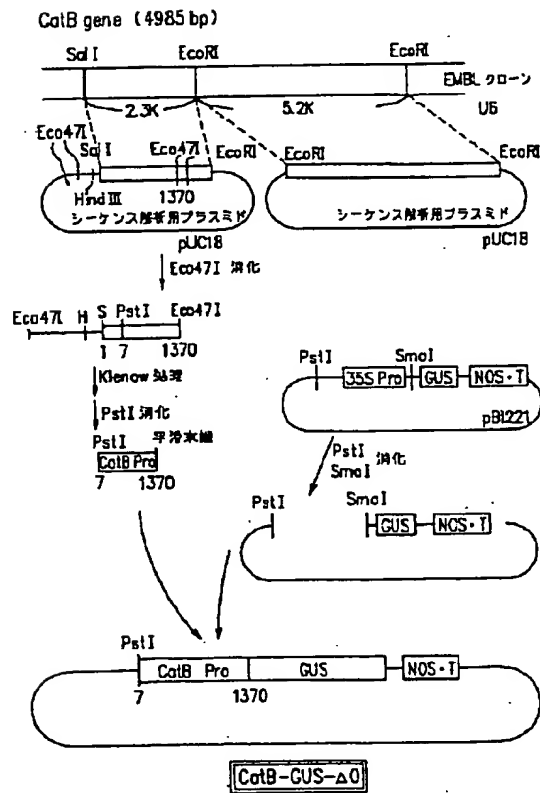
【図4】プラスミドCatC-GUS-△0の作製を示す模式図である。

【図5】各プロモーターの活性を比較した図である。

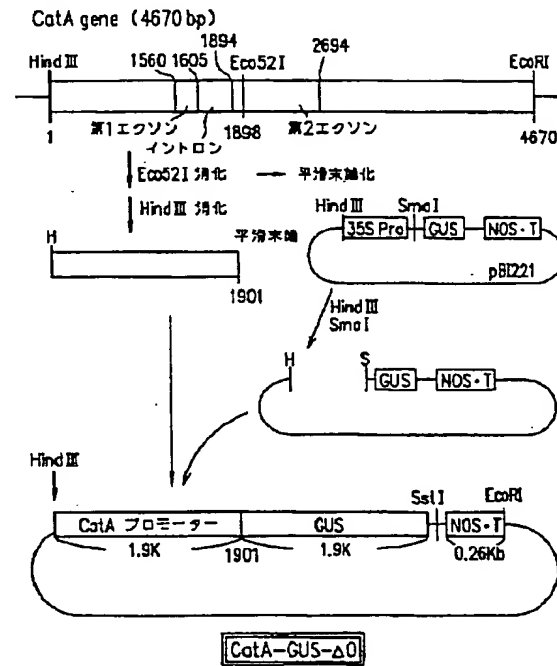
【図 1】



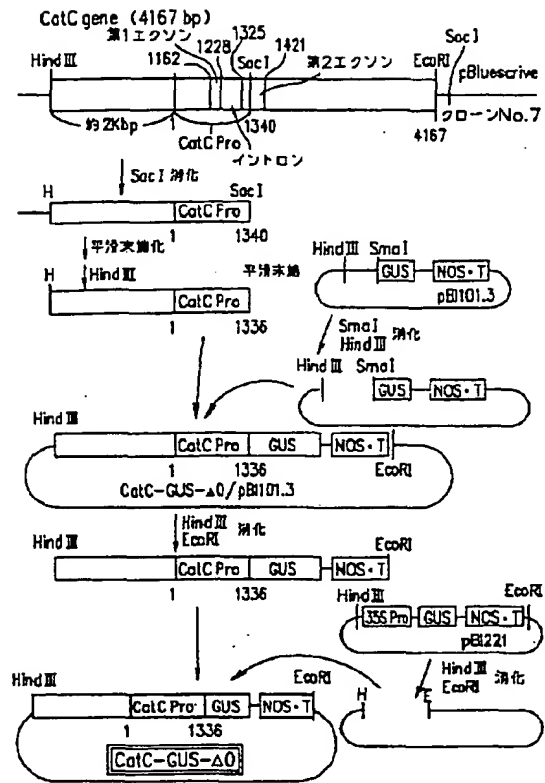
【図 2】



【図 3】



【図4】



【図5】

